



ANNALES

**CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES RAVAGEURS
EN AGRICULTURE**

**INTERNATIONAL CONFERENCE
ON PESTS IN AGRICULTURE**

TOME I

7-8-9 décembre 1993

le Corum - Montpellier

ANPP - TROISIEME CONFERENCE INTERNATIONALE SUR LES
RAVAGEURS EN AGRICULTURE
MONTPELLIER 7-8-9 DECEMBRE 1993

LOCALISATION *IN VITRO* PAR CYTOMETRIE EN IMAGE A BALAYAGE
LASER (CIBL) DES "SITES D'ACCROCHAGE" DE TOXINE DE *BACILLUS*
THURINGIENSIS CHEZ LES INSECTES.

L.M.FIUZA*, L.DRIF*, N.MICHAUX-FERRIERE*, R.FRUTOS* et P.VAGO**

* BIOTROP-CIRAD, 2477 Avenue du Val de Montferrand,
B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France.

** CRIC-INSERM - U 254, Hôpital St Charles, 34059 Montpellier cedex, France.

RESUME:

La cytométrie en image à balayage laser (CIBL) permet de localiser et de quantifier la fluorescence au niveau tissulaire. Des observations préliminaires ont été réalisées sur des sections histologiques de larves de lépidoptères afin de mettre en évidence, après immunomarquage en fluorescence, la distribution des sites d'accrochage des toxines de *B. thuringiensis*. Les premiers résultats obtenus montrent que, si le marquage visualisé (et quantifié) se trouve bien au niveau des microvillosités, il n'est pas continu. Il serait préférentiellement localisé dans des zones précises de l'intestin moyen de l'insecte.

Mots-clés: *Bacillus thuringiensis*, immunolocalisation, fluorescence, insecte, site d'accrochage, cytométrie à balayage laser.

SUMMARY

Laser scanning cytometry allows the measurement and localization of fluorescence on tissue. Binding of *Bacillus thuringiensis* toxins was immunocytochemically analysed on tissue sections of lepidoptera larvae. Preliminary results indicate that toxins bound to the microvilli of the midgut epithelial cells, and that the binding sites are not localized on the entire length of the brush border membrane. Moreover, the fluorescence seems to be emitted only from particular area of the insect midgut.

Key-words: *Bacillus thuringiensis*, immunolocalization, fluorescence, insect, binding sites, scanning laser cytometry.

INTRODUCTION

La détection immunologique des sites d'accrochage des toxines de *Bacillus thuringiensis* sur coupes histologiques n'a jusqu'à présent été recherchée qu'en microscopie photonique et électronique à l'aide de marqueurs enzymatiques (BRAVO *et al.*, 1992 ; RAVOHANGIMALALA *et al.*, 1993) ou de toxines iodinyllées (DENOLF *et al.*, 1993).

La cytométrie en image à balayage laser (CIBL) permet non seulement de localiser mais aussi de quantifier la fluorescence au niveau de cellules adhérentes et des tissus non dissociés avec une très grande sensibilité (METEZEAU *et al.*, 1993). Des images de fluorescence sont établies par l'informatique de l'appareil à partir de l'intensité de lumière émise à longueur d'onde donnée en chaque point des préparations.

Nous avons utilisé cette technique pour mettre en évidence les sites d'accrochage d'une toxine CryIA(b) de *Bacillus thuringiensis* au niveau du tube digestif des larves de *Chilo suppressalis* et *Plutella xylostella* insectes lépidoptères.

MATERIELS ET METHODES

Les tubes digestifs des larves de quatrième stade sont disséqués puis fixés dans du Bouin Hollande 10% sublimé (BRANDTZAEG, 1982) pendant 24 heures à 4° C. Les intestins sont rincés dans de l'eau bidistillée avant d'être déshydratés par des bains successifs d'éthanol de concentration croissante puis inclus dans la paraffine à point de fusion de 58°C (BRAVO *et al.*, 1992). Des coupes de 7 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome (Hisorange 2218, LKB). Elles sont ensuite déparaffinées puis rehydratées avant d'être incubées dans une solution de toxine CryIA(b) (10 µg.ml⁻¹). CryIA(b) est préalablement purifiée, solubilisée et activée par trypsination selon la méthode de HOFTE *et al.* (1986). Toutes les lames sont rincées avec un tampon Tris-Sodium-Triton pH 7.6 afin d'éliminer les molécules non liées.

Les coupes sont traitées pendant une heure avec un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la toxine puis par un anti-IgG couplé à la fluoresceïne (Biosys). Pour les échantillons témoins la toxine et / ou l'anticorps primaire sont remplacés par le tampon de lavage.

Les sections histologiques ainsi préparées sont analysées avec un CIBL ACAS 570 (Meridian Instruments, Okemos, MI) équipé d'un microscope inversé OMT2 (Olympus Optical, Hambourg, Allemagne) et d'une source lumineuse laser Innova 90.5 (Coherent, Palo Alto, CA) réglée à 488 nm pour émettre un faisceau de 200 mW en mode de régulation lumière.

L'excitation par le laser faite en mode "balayage X /Y point par point" au travers d'un objectif 100x à immersion est réalisée à 10% de l'intensité du faisceau avec un pas de 1 µm.

La lumière de fluorescence du FITC (520 nm) est quantifiée par un photomultiplicateur. Les données obtenues sont traitées par le module informatique qui établit des images de fluorescence pour la longueur d'onde d'excitation.

La répartition préférentielle de la fluorescence entre la région des microvillosités (R1) et la région basale des cellules épithéliales, au contact de la membrane basale, (R2) est appréciée à partir du rapport des fluorescences moyennes émises dans chacune de ces régions (R1/R2).

Des échantillons témoins, traités par la toxine ou l'anticorps primaire, sont également constitués et analysés pour prendre en compte l'émission de fluorescence non spécifique.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les premières analyses permettent de localiser la fluorescence au niveau de l'intestin moyen des larves de *Chilo suppressalis* et *Plutella xylostella*. Ces observations indiquent que les sites d'accrochage de CryIA(b) se trouvent au niveau de la bordure en brosse des cellules intestinales pour les deux espèces d'insectes (le rapport R1/R2 est supérieur à 2; il est de l'ordre de 1 pour les échantillons témoins). Par ailleurs, le marquage est discontinu et ne paraît pas uniformément réparti sur toute la surface des microvillosités de l'intestin.

Dans le cas de *C. suppressalis*, l'intensité de fluorescence est plus élevée dans les zones antérieures de l'intestin moyen. Les sites d'accrochage de CryIA(b) sont probablement plus nombreux dans ces régions où les microvillosités en section présentent des longueurs différentes. La fluorescence est plus importante dans les zones où les microvillosités sont plus effilées et plus longues. Au niveau des régions postérieures de l'intestin où la bordure en brosse est régulière le marquage est plus faible.

Ces résultats préliminaires sont encourageants: le CIBL s'avère un bon outil pour localiser précisément les sites d'accrochage des toxines, non seulement dans l'épaisseur de l'épithélium intestinal, mais aussi tout au long du tube digestif. Le but des travaux en cours est de mettre en évidence la distribution des sites d'accrochage de différentes toxines de *B. thuringiensis* chez *C. suppressalis* et leur éventuelle compétition au niveau de l'intestin moyen de l'insecte.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BRAVO, A., HENDRICKS, K. JANSSENS, S. & PEFEROEN, M. 1992. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to Lepidopteran and Coleopteran midgut membranes. *J. Invertebr. Pathol.* 60, 247-253.

BRANDTZAEG, P. 1982. Tissue preparation methods for immunocytochemistry. In "Techniques in immunocytochemistry" G.R. Bullock and P. Petrus, Eds.), Vol. 1 pp. 1-76. Academic Press, London.

DENOLF, P., JANSENS, S., VAN HOUTT, S., PEFEROEN, M., DEGHEEL, D. & VAN RIE, J. 1993. Biotinylation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (6), 1821-1827.

HÖFTE, H., DE GREVE, H., SEURINCK, J., JANSENS, S., MAHILLON, J., AMPE, C., VANDEKERCKHOVE, J., VANDERBRUGGEN, H., VAN MONTAGU, M., ZABEAU, M. & VAECK, M. 1986. Structural and functional analysis of a cloned delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* berliner 1715. *Eur. J. Biochem.* 161, 273-280.

METEZEAU, Ph. KIEFER, H., LAMY, G. & DELAMARE, G. 1993. La cytométrie en image à balayage laser, analytique et préparative. *Pathologie Biologie*, 41 (3), 276-280.

RAVOAHANGIMALALA, O., CHARLES, J.F. & SCHOLLER-RACCAUD, J. 1993. Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar israeliensis toxins in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Res. Microbiol.* (Inst. Pasteur) 144, 271-278.